

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ**

Aleksandra Kavgić

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, srpanj 2016.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Aleksandra Kavgić

*Sinteza i antioksidativna svojstva L-askorbinske kiseline i njezinih derivata /
Synthesis and antioxidative properties of L-ascorbic acid and its derivatives*

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Silvana Raić-Malić

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. prof. dr. sc. Silvana Raić-Malić
2. dr. sc. Andrijana Meščić
3. doc. dr. sc. Šime Ukić

Zagreb, srpanj 2016.

Ovaj rad izrađen je na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, na Zavodu za organsku kemiju pod vodstvom prof. dr. sc. Silvine Raić-Malić.

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Raić-Malić na iskazanom povjerenju, predloženoj temi i omogućavanju izrade rada te na znanstvenom i stručnom usmjeravanju.

Zahvaljujem dr. sc. Andrijani Meščić na izuzetnoj pomoći i posvećenom vremenu, uloženom trudu te prijenosu znanja i iskustva.

Posebno zahvaljujem svojim roditeljima i zaručniku na bezuvjetnoj podršci, poticaju i vjeri u moj uspjeh.

SAŽETAK RADA

Sinteza i antioksidativna svojstva L-askorbinske kiseline i njezinih derivata

Cilj ovog rada bila je regioselektivna sinteza 1,4-disupstituiranih 1,2,3-triazolnih derivata L-askorbinske kiseline (**3** – **8**) kao potencijalnih antitumorskih spojeva. U tu svrhu sintetizirana je 6-*O*-tosil-2,3-*O,O*-dibenzil-L-askorbinska kiselina (**1**) koja je potom prevedena u odgovarajući azidni derivat L-askorbinske kiseline (**2**). 1,2,3-triazolni derivati L-askorbinske kiseline (**3** – **8**) pripremljeni su reakcijom 1,3-dipolarne cikloadicije azida (**2**) i odgovarajućih terminalnih alkina potpomognutom mikrovalnim zračenjem s Cu(I), kao katalizatorom, prema konceptu "klik" kemije. S ciljem dobivanja većeg sveukupnog iskorištenja reakcija kojima nastaju ciljani produkti korištena su dva sintetska puta. Prvi sintetski put uključuje reakciju prevođenja tosilatnog derivata L-askorbinske (**1**) u azid (**2**) i njegovu izolaciju te potom "klik" reakciju azida (**2**) i odgovarajućih alkina u 1,4-disupstituirane 1,2,3-triazolne derivate L-askorbinske kiseline (**3** – **8**). Drugi sintetski put je bila tandemaska reakcija u kojoj se azid (**2**) nije izolirao nego je nastao *in situ* iz tosilatnog derivata (**1**) i reakcijom s odgovarajućim alkinima dobiveni su 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazolni derivati L-askorbinske kiseline (**3**, **5**). Kako bi se ispitalo antioksidativno djelovanje 1,4-disupstituiranih 1,2,3-triazolnih derivata L-askorbinske kiseline, uklanjanjem benzilne zaštite priređen je spoj **9** sa slobodnih hidroksilnim skupinama. Strukture svih sintetiziranih spojeva potvrđene su spektroskopijom ^1H i ^{13}C NMR.

Ključne riječi: L-askorbinska kiselina, 1,2,3-triazoli, "klik" kemija, 1,3-dipolarna cikloadicija

SUMMARY

Synthesis and antioxidative properties of L-ascorbic acid and its derivatives

The aim of this work was the regioselective synthesis of 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole L-ascorbic acid derivatives (**3 – 8**) with potential antitumor activity. For this purpose, 6-*O*-tosyl-2,3-*O,O*-dibenzyl-L-ascorbic acid (**1**) was prepared and then converted to the corresponding azido derivative of L-ascorbic acid (**2**). 1,2,3-Triazole derivatives of L-ascorbic acid (**3 – 8**) were prepared by microwave assisted 1,3-dipolar cycloaddition reaction of the azide (**2**) and corresponding terminal alkynes with Cu(I), as a catalyst, based on the concept of "click" chemistry. In order to obtain better overall yield of target compounds, two synthetic pathways were used. First pathway includes the conversion of the tosylated L-ascorbic acid derivative (**1**) to the azide (**2**), its isolation and then a "click" reaction of the azide (**2**) and corresponding alkynes to form 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole L-ascorbic acid derivatives (**3 – 8**). Second synthetic pathway was a tandem reaction in which the azido derivative (**2**) was not isolated, but was formed *in situ* from the tosylated derivative (**1**) and *via* reaction with the corresponding alkynes 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole derivatives of L-ascorbic acid (**3, 5**) were obtained. In order to explore the antioxidant properties of the 1,2,3-triazole L-ascorbic acid derivatives, compound with free hydroxyl groups (**9**) was prepared by removal of the benzyl protecting groups. The structures of all compounds have been confirmed by ¹H and ¹³C NMR spectroscopy.

Keywords: L-ascorbic acid, 1,2,3-triazoles, "click" chemistry, 1,3-dipolar cycloaddition

SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
2. Opći dio.....	3
2.1. L-askorbinska kiselina.....	4
2.1.1. Struktura L-askorbinske kiseline i antioksidativna svojstva.....	4
2.1.2. Biološka aktivnost L-askorbinske kiseline i njezinih derivata.....	6
2.2. 1,2,3-triazoli	7
2.2.1. Struktura triazolnog prstena i 1,2,3-triazola	7
2.2.2. Biološko djelovanje 1,2,3-triazola	8
2.3. "Klik" kemija.....	9
2.3.1. Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija alkina i azida.....	9
2.3.2. Mehanizam CuAAC reakcije.....	11
2.4. Sintaza potpomognuta mikrovalnim zračenjem	12
2.4.1. Teorija mikrovalova.....	13
3. Eksperimentalni dio	15
3.1. Opće napomene	16
3.2. Pregled sintetiziranih spojeva.....	17
3.3. Postupci za pripremu spojeva 1 – 9	18
4. Rezultati i rasprava.....	23
4.1. Sinteze spojeva	24
4.2. Analiza spektara ¹ H NMR	26
5. Zaključci.....	29
6. Literatura	31
7. Životopis	34

1. UVOD

Kako bi se pronašli biološki aktivni spojevi, potrebno je ujediniti znanja iz raznih područja znanstvenih disciplina. Medicinska kemija bavi se dizajnom, sintezom i razvojem novih agensa za liječenje bolesti. Razvoj lijekova predstavlja velike izazove. Da bi bio učinkovit, lijek se mora vezati za metu visokim afinitetom uz visoku specifičnost vezanja, mora se moći na jednostavan način primijeniti na bolesnoj osobi i mora u organizmu ostati nepromijenjen dovoljno dugo kako bi dospio do ciljnog mjesta. U svrhu prevencije neželjenih popratnih učinaka, lijekovi ne smiju utjecati na svojstva drugih biomolekula u organizmu. Ti zahtjevi znatno sužavaju izbor spojeva koji mogu postati klinički korisni lijekovi.

Potencijalni lijekovi mogu se otkriti na dva načina: slučajnim opažanjem, postupkom sustavnog probiranja ili ciljanom sintezom. Drugi pristup započinje s poznatom ciljnom molekulom, a nakon njene sinteze istražuju se učinci na prikladnim stanicama ili organizmima.¹

Mnogi se lijekovi primjenjuju tijekom duljeg razdoblja, a da ne dođe do smanjenja njihove učinkovitosti. U nekim se slučajevima, posebice pri liječenju zaraznih bolesti ili raka, primjećuje pad terapijskog učinka lijeka tijekom liječenja. Dolazi do razvoja otpornosti bolesti na primjenu lijeka. Stanice raka odlikuje sposobnost brzog rasta bez nadzornih mehanizama koji su prisutni u normalnim stanicama. Sklonost stanica raka brzim mutacijama je veliki izazov za područje liječenja raka.

S obzirom da neki pirimidinski i purinski derivati L-askorbinske kiseline pokazuju izraženo antitumorsko djelovanje na tumorske stanice², a brojne molekule koje u svojoj strukturi imaju 1,2,3-triazolni prsten pokazuju antimikrobnu, analgetsku, antimalarijsku, antivirusnu te antitumorsku aktivnost, povezivanjem dvaju farmakofora sintetiziran je niz novih potencijalno biološki aktivnih 1,2,3-triazolnih derivata L-askorbinske kiseline kojima će se ispitati antiproliferativno djelovanje i antioksidativna svojstva.

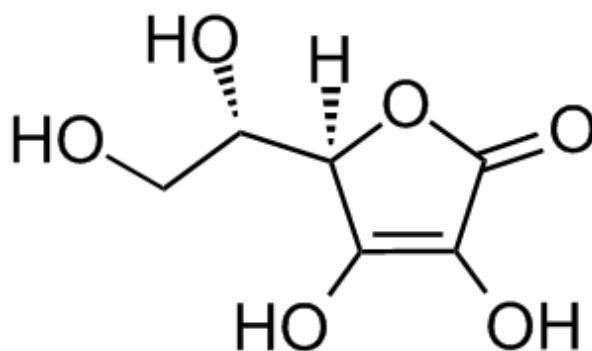
2. OPĆI DIO

2.1. L-askorbinska kiselina

L-askorbinska kiselina je bijeli kristalinični prah kiselog okusa, bez mirisa, osjetljiva na svjetlost i toplinu. Potpuno je topljiva u vodi pri čemu nastaje bezbojna otopina. Poznata je pod nazivom vitamin C. Ljudi je ne mogu sintetizirati zbog nedostatka L-gulonolakton-oksidge, enzima potrebnog u biosintetskom stvaranju tog vitamina te se stoga nužno unosi iz prehrambenih izvora. Ima važnu ulogu u ljudskom tijelu. Potrebna je za sintezu kolagena u vezivnom tkivu, sintezu hormona, neurotransmitora te u metabolizmu određenih aminokiselina i vitamina. Također se smatra važnom u prevenciji različitih kroničnih bolesti poput raka, cerebralne apopleksije, dijabetesa, atopičnog dermatitisa, srčanog udara i AIDS-a.^{2, 3}

2.1.1. Struktura L-askorbinske kiseline i antioksidativna svojstva

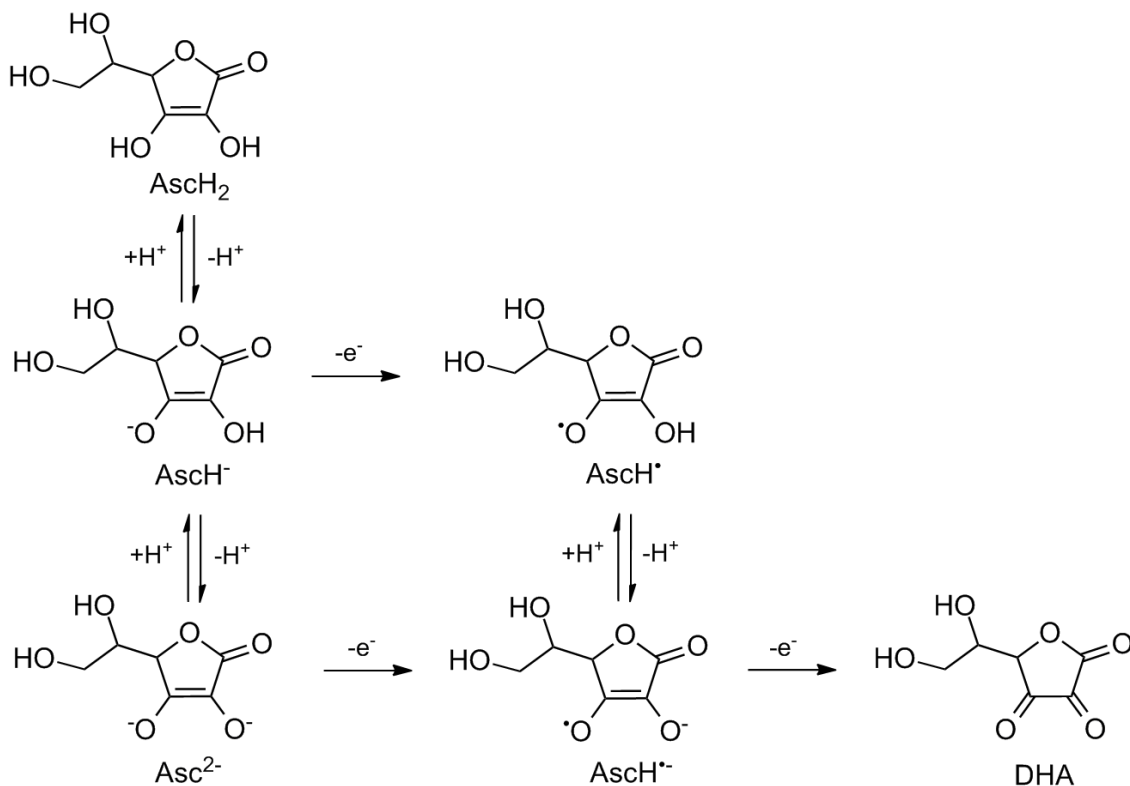
L-askorbinska kiselina (AscH_2) je enolna forma α -ketolaktone sa šest ugljikovih atoma, strukturom slična glukozi i ostalim heksozama, a ima dva kiralna centra. Sadrži nekoliko strukturnih elemenata koji doprinose njenom kemijskom ponašanju: struktura laktone, dvije enolne hidroksilne skupine (položaji 2 i 3) i primarna i sekundarna hidroksilna skupina (položaji 5 i 6) (slika 1).⁴



Slika 1. Struktura L-askorbinske kiseline, α -ketolaktone molekulske formule $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ i molekulske mase 176,13

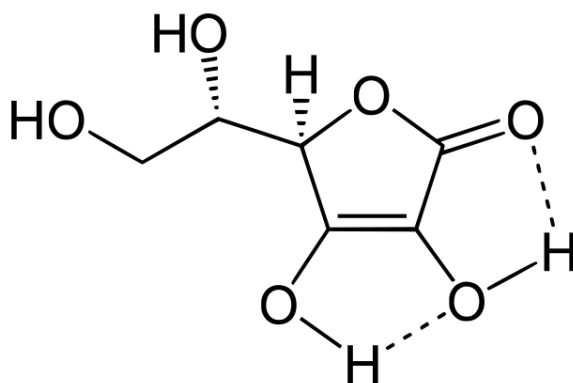
Postoji ravnoteža između tautomera gdje se skupine na položajima 1 ($=\text{O}$) i 3 ($-\text{OH}$) izmjenjuju prebacivanjem dvostruke veze. Zbog svoje endiolne strukture L-askorbinska kiselina pokazuje antioksidativna svojstva. Ovisno o pH vrijednosti medija i oksidacijskom stanju, L-askorbinska kiselina se pojavljuje u različitim oblicima. U fiziološkim uvjetima

99,95% vitamina C prisutno je u obliku askorbatnog monoaniona (AscH^-).⁵ Askorbatni monoanion je odličan reducens i lako se oksidira u monohidroaskorbatni radikal (AscH^{\bullet}) koji se zatim disproporcionira do askorbinske i dehidroaskorbinske kiseline (DHA) (shema 1). Ova je reakcija ubrzana u prisutnosti katalitičnog metala.



Shema 1. Ravnoteža L-askorbinske kiseline i njenih oksidiranih oblika

L-askorbinska kiselina može tvoriti dvije unutarmolekulske vodikove veze koje bitno doprinose stabilnosti i kemijskim svojstvima (slika 2).⁵



Slika 2. Vodikove veze L-askorbinske kiseline

2.1.2. Biološka aktivnost L-askorbinske kiseline i njezinih derivata

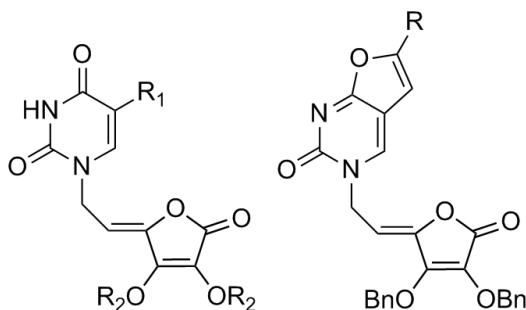
L-askorbinska kiselina djeluje kao elektron donor i antioksidans iz čega proizlaze sva njezina fiziološka i biokemijska djelovanja.⁴ Antioksidansi brane tijelo od slobodnih radikala i reaktivnih molekula. Djeluju na nekoliko načina: onemogućuju stvaranje novih slobodnih radikala u organizmu, uništavaju postojeće radikale ili popravljaju oštećenja u stanici nastala djelovanjem radikala. Oksidacijsko oštećenje može utjecati na strukturu i funkciju brojnih biomolekula (lipida, ugljikohidrata, proteina i nukleinskih kiselina) što rezultira promjenama u strukturi i funkciji stanica, tkiva i organa. L-askorbinska kiselina reducira nestabilne i reaktivne radikale (kisikove, dušikove, sumporove) te na taj način sprječava pojavu oštećenja.^{6,7}

Iako L-askorbinska kiselina ima mnoge funkcije u ljudskom organizmu, posebno se istražuje njezina toksičnost na stanice karcinoma. Mehanizam uništavanja stanica karcinoma zasnovan je na stvaranju vodikovog peroksida koji nastaje u složenoj interakciji L-askorbinske kiseline s dvovalentnim ionima bakra i trovalentnim ionima željeza. L-askorbinska kiselina reducira dvovalentni ion bakra u jednovalentni, a trovalentni ion željeza u dvovalentni. Produkt te redoks reakcije je vodikov peroksid, ključni faktor antitumorskog djelovanja L-askorbinske kiseline koji izaziva apoptozu i nekrozu tumorskih stanica, a nema utjecaj na zdrave stanice. Smatra se da su tumorske stanice mnogo osjetljivije prema djelovanju vodikovog peroksida od zdravih stanica jer zbog nedostatka enzima katalaze posjeduju manju sposobnost razgradnje vodikovog peroksida.^{8,9}

Hidroksilne skupine na laktonskom prstenu L-askorbinske kiseline na položajima C-2 i C-3 su iznimno značajne zbog biološke aktivnosti *in vivo*. Hidroksilna skupina na položaju C-6 L-askorbinske kiseline je pokazala zanemariv značaj u transportu i funkciji ovog vitamina. Hidroksilna skupina na položaju C-2 nalazi se u fokusu reakcije u redoks procesima L-askorbinske kiseline i značajna je za redukcijska svojstva. Prema tome bi kemijske modifikacije hidroksilne skupine na položaju C-6 trebale imati značajan utjecaj na biološka svojstva kiseline (slika 3).² Dokazano je da 5,6-*O,O*-modificirani derivati L-askorbinske kiseline pokazuju antitumorsko djelovanje na različite tumore porijeklom iz čovjeka te induciraju apoptozu u tumorskim stanicama (slika 3), C-2 alkilni derivati posjeduju

imunostimulatornu aktivnost, a C-2-O- i C-3-O- alkilirani derivati djeluju kao zaštitni reagensi protiv peroksidacije lipida biomembrana.¹⁰

R ₁	R ₂	IC ₅₀ / μM
oktil	Bn	2,0 - 12,0
etnil-(p-pentil-Ph)	Bn	3,0 - 10,0
etnil-(p-butil-Ph)	Bn	4,0 - 17,0
propinil	Bn	0,2 - 0,78
furil	Bn	1,6 - 7,0
vinil	Bn	3,8 - 22,0
etnil	Bn	2,9 - 8,7
izopentil	Bn	2,0 - 8,3
etnil-Ph	H	1,0 - 8,2



R	IC ₅₀ / μM
butil	4,5 - 16,0
p-Br-Ph	8,3 - 20,0

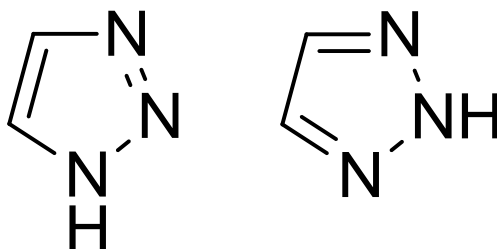
Slika 3. C-5 supstituirani arilni, alkenilni, alkinilni pirimidinski i furo[2,3-*d*]pirimidinski derivati 4',5'-didehidro-L-askorbinske kiseline s citotoksičnim djelovanjem (L 1210, Molt4/C8, CEM, HeLa, MiaPaCa-2, SW 620, MCF-7, H-460)¹¹

2.2. 1,2,3-triazoli

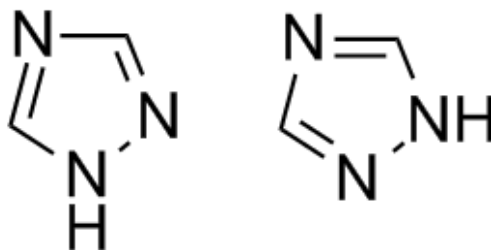
1,2,3-triazoli su heterociklički aromatski spojevi koji posljednjih godina privlače veliku pozornost zbog svojeg širokog raspona bioloških djelovanja prema raznim virusima i malignim stanicama mikroorganizama.

2.2.1. Struktura triazolnog prstena i 1,2,3-triazola

Triazoli, heterociklički spojevi molekulske formule $C_2H_3N_3$, sadrže peteročlani triazolni prsten koji se sastoji od tri atoma dušika i dva atoma ugljika. Ovisno o položaju dušikovih i ugljikovih atoma razlikuju se dva izomera triazola: 1,2,3-triazol i 1,2,4-triazol, a svaki postoji u dva tautomera oblika (slike 4 i 5).



Slika 4. $1H$ -1,2,3-triazol i $2H$ -1,2,3-triazol

Slika 5. 1*H*-1,2,4-triazol i 2*H*-1,2,4-triazol

1,2,3-triazolni prsten može stvarati π - π interakcije s aromatskim prstenima. Triazolni prsten posjeduje i dipolni moment (5,2 – 5,6 Debye). Dva atoma dušika (N-2 i N-3) u strukturi triazola mogu stvarati vodikove veze s donorima vodikovih veza ili koordinirati s metalnim ionima. Vodikove veze i dipolne interakcije s triazolom mogu pogodovati vezanju na biomolekule i povećati njihovu topljivost. 1,2,3-triazoli su izuzetno otporni na metaboličku i kemijsku razgradnju te inertni pri hidrolitičkim, oksidacijskim i redukcijским uvjetima i višim temperaturama.

2.2.2. Biološko djelovanje 1,2,3-triazola

Iako se u prirodi ne pojavljuju, sintetske molekule koje sadrže 1,2,3-triazolni prsten imaju značajnu biološku aktivnost. Triazolni prsten nalazimo u molekulama koje pokazuju antitumorska, antivirusna i antimikrobna djelovanja.¹² 1,2,3-triazolni prsten se često u procesu razvoja lijekova koristi kao rigidna poveznica između spojeva koji imaju farmakološko djelovanje pri čemu ne predstavljaju samo pasivnu poveznicu, već imaju i zadovoljavajuća fizikalno-kemijska svojstva. Imitiraju atome i elektronska svojstva peptidne veze, a otporni su na hidrolitičku razgradnju.¹³ S obzirom na izvanrednu stabilnost triazalnog prstena u kiselim, bazičnim, oksidativnim i reduktivnim uvjetima te mogućnost stvaranja dipol-dipol, π - π interakcija i vodikovih veza, sintetiziraju se brojni klinički primjenjivi nukleozidni analozi. Razvoju novih potencijalno biološki aktivnih derivata s ugrađenom strukturom triazalnog prstena posebno je doprinijelo otkriće ribavirina koji se primjenjuje u terapiji hepatitisa C te imunosupresivnog agensa mizoribina.¹⁴

Derivate triazola nalazimo u raznim farmaceuticima kao što su antibiotici, inhibitori HIV proteaze, antituberkulotici i antitumorski lijekovi. Koriste se kao lijekovi protiv gljivica,

fungicidi u poljoprivredi, inhibitori su za mnoge metale i legure, a u industriji služe kao boje i bjelila za vlakna.¹⁵ Mogu se sintetizirati na razne načine, a jedan od njih je pomoću 1,3-dipolarne cikloadicije uz prisutnost katalitičke količine bakra.

2.3. "Klik" kemija

Pojam "klik" kemije prvi su put upotrijebili *Sharpless i suradnici* 2001. godine, a nedvojbeno predstavlja jedan od najpopularnijih pristupa u suvremenoj organskoj sintezi. Njime su objedinili široku paletu kemijskih reakcija u kojima se brzo i pouzdano dolazi do produkata na način da se manje jedinice povežu heteroatomima.¹⁴ Koncept "klik" kemije se odnosi na skupinu reakcija koje karakterizira brzina, jednostavnost, lako pročišćavanje, svestranost, regiospecifičnost i visoka iskorištenja. Tražene karakteristike zahtijevaju jednostavne reakcijske uvjete, lako dostupne polazne materijale i reagense, nekorištenje otapala ili korištenje neškodljivih otapala i otapala koja se mogu lako ukloniti te jednostavnu izolaciju produkta. Produkt mora biti stabilan u fiziološkim uvjetima, a pročišćava se nekom od nektromatografskih metoda poput kristalizacije ili destilacije. "Klik" reakcije posjeduju navedene karakteristike zbog svoje velike termodinamičke energije koja uglavnom prelazi i 20 kcal/mol. Takvi se procesi brzo odvijaju do kraja, a također pokazuju visoku selektivnost za jedan produkt.¹⁶ Identificirane su četiri glavne skupine "klik" reakcija: cikloadicije, nukleofilna otvaranja prstena, karbonilne reakcije ne-aldola i adicije na C-C višestruke veze.

Postoji velik broj reakcija koje ispunjavaju navedene kriterije, a najznačajniji primjer je Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija azida i terminalnih alkina katalizirana Cu(I) ionima kojom nastaju 1,2,3-triazoli (krat. CuAAC, engl. Copper Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition).¹⁷

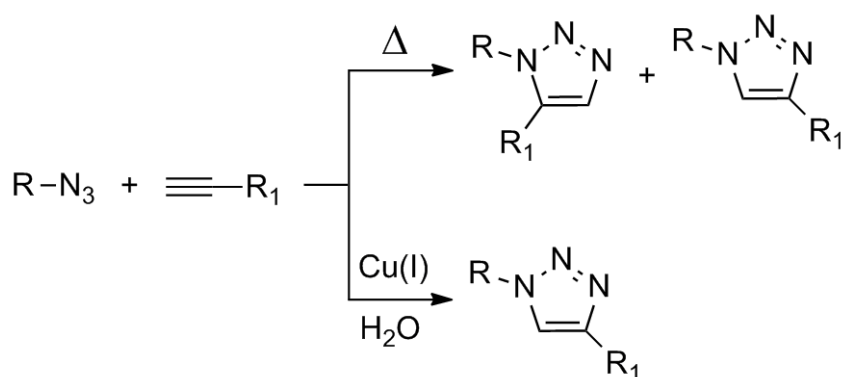
2.3.1. Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija alkina i azida

Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija alkina i azida se primjenjuje u raznim područjima istraživanja uključujući znanost materijala, kemiju polimera i farmaceutsku znanost. Postoji veliki broj znanstvenih radova o Huisgenovoj 1,3-dipolarnoj cikloadiciji vezanih uz dizajn novih lijekova, biokonjugaciju, kemiju polimera i razvoj novih materijala, supramolekularnu kemiju, označavanje DNA i sintezu oligonukleotida, povezivanje

glikozidnih klastera i dendrimera, pripremu stacionarnih faza za kolone za HPLC i dr. Kao veliko područje primjene reakcije CuAAC posebno se izdvajaju modifikacije nukleinskih kiselina i njihovih oligomera.¹⁴

Prvu 1,3-dipolarnu cikloadiciju alkina i azida proveo je njemački kemičar R. Huisgen 1963. godine po kojem je i dobila ime.¹⁸ U nekataliziranoj Huisgenovoj reakciji kao produkt nastaje smjesa 1,4- i 1,5-disupstituiranih 1,2,3-triazola (shema 2). Reakcija je vrlo spora, zahtjeva visoku temperaturu i tlak. Također je egzotermna, a nisko iskorištenje reakcije rezultat je velike energije aktivacije čak i pri povišenoj temperaturi.

Upotrebom Cu(I) iona kao katalizatora reakcijom nastaju samo 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazoli (shema 2). Stabilni su u hidrolitičkim i oksidoredukcijskim uvjetima te pri višim temperaturama, ali se već pri sobnim temperaturama mogu postići visoka reakcijska iskorištenja. Bakar se u reakciju može uvesti izravno ili *in situ*. Neposredna primjena katalizatora Cu(I) najčešće uključuje primjenu soli Cu(I) (najčešće CuI ili CuBr) ili kompleksa. Kompleksi su se pokazali kao dobro rješenje kod reakcija u organskim otapalima gdje je topljivost Cu(I) soli ograničena. U slučaju polarnih supstrata najčešće se primjenjuje vodeni medij i CuSO₄, izvor Cu(II) iona kojim se zatim *in situ* prevodi u Cu(I) ione pomoću redukcijskog sredstva kao što je natrijev askorbat ili Cu žica. Osim Cu(I) i Cu(II) kao izvora bakra, poznate su i primjene katalizatora Cu(0) (bakrena žica ili bakreni prah) te nanočestica bakra. Reakcija se može provesti u različitim otapalima poput vode, etanola ili *tert*-butil-alkohola pri čemu topljivost polaznih reagensa ne utječe na uspješnost reakcije. S obzirom da se sintetiziraju potencijalno biološki aktivni spojevi koji se pripremaju u svrhu bioloških testiranja, posebnu pažnju treba obratiti na kontaminaciju spojeva bakrovim solima.^{14, 17}



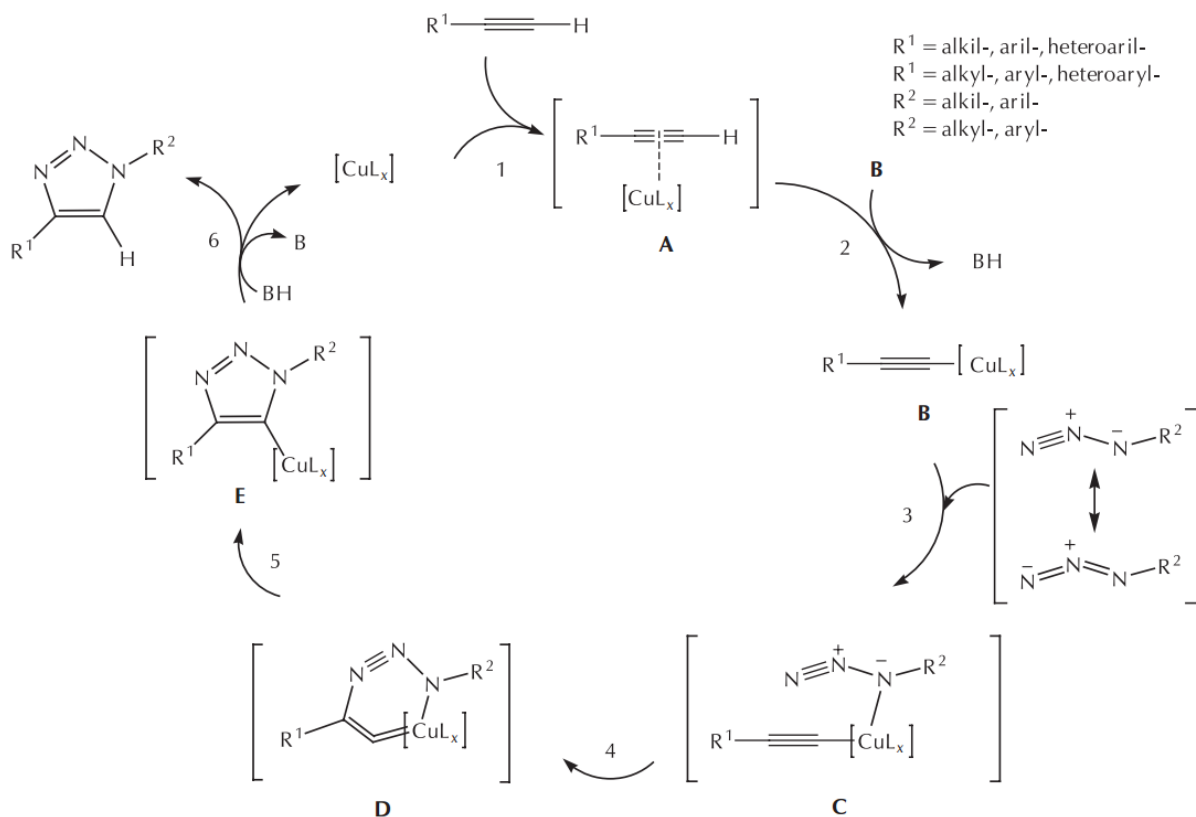
Shema 2. Općeniti primjer Huisgenove 1,3-dipolarne cikloadicije bez katalizatora i katalizirane Cu(I) ionima

Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija alkinu i azidu katalizirana Cu(I) ionima (CuAAC) pri čemu nastaje 1,2,3-triazolni prsten odlično zadovoljava sve kriterije "klik" kemije. Ovom reakcijom nastaje isključivo 1,4-disupstituirani produkt što je čini regiospecifičnom. Uglavnom ne zahtijeva povišene temperature, ali se može odvijati u širokom rasponu temperatura (0 – 160°C), u različitim otapalima (uključujući i vodu) te u širokom području pH vrijednosti (5 – 12). Odvija se značajno brže od nekatalizirane reakcije, a pročišćavanje uglavnom uključuje filtraciju produkta. U ovoj reakciji mogu sudjelovati različito supstituirani primarni, sekundarni, tercijarni i aromatski azidi s raznovrsnim alkinima. Azidi i terminalni alkinu se prilično lako ugrađuju u molekulu koja je izuzetno stabilna pri standardnim uvjetima.¹⁶

2.3.2. Mehanizam CuAAC reakcije

Primjenom Cu(I) iona kao katalizatora snižava se energije aktivacije za približno 11 kcal/mol što povećava brzinu reakcije $10^7 - 10^8$ puta u odnosu na nekataliziranu 1,3-dipolarnu cikloadiciju. Na shemi 3 prikazan je pretpostavljeni mehanizam CuAAC. U "klik" reakcijama kataliziranim Cu(I) ionima sudjeluje isključivo terminalni alkin. U prvom koraku reakcije Cu^+ koordinira π -elektrone alkinu i nastaje π -kompleks bakra i alkinu (**A**). Koordinacijom Cu^+ na trostruku vezu između dva ugljikova atoma smanjuje se pKa terminalnog protona alkinu što omogućuje deprotonaciju i nastanak bakrovog acetilida (**B**). Kompleks bakrovog acetilida koordinira azid pri čemu nastaje intermedijar (**C**), a njegovom pregradnjom nastaje

šesteročlani prsten (**D**) u koji je uključen i bakar. U sljedećem koraku nastaje triazolil (**E**) čijim protoniranjem se oslobađa bakar i nastaje 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazol.¹⁴



Shema 3. Pretpostavljeni mehanizam CuAAC reakcije

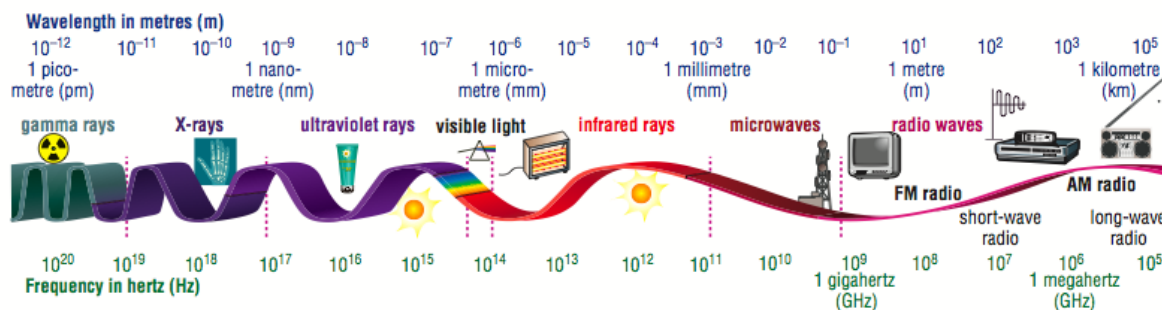
2.4. Sinteza potpomognuta mikrovalnim zračenjem

Mikrovalno zagrijavanje se posljednjih godina intenzivno primjenjuje za poticanje kemijskih procesa kao alternativa klasičnom zagrijavanju. Početak razvoja tehnologije veže se uz kasne 1980-e i rane 1990-e kada je zbog nedostatka kontrole i niske reproducibilnosti te općenitog nerazumijevanja mehanizma mikrovalnog zagrijavanja taj razvoj bio dosta spor. Glavni problem bili su rizici povezani sa zapaljivosti organskih otapala u mikrovalnom polju i nedostatak dostupnih sustava za odgovarajuće temperature i tlakove. Prvi eksperimenti provodili su se u modificiranim kuhinjskim mikrovalnim pećnicama dok se danas kemijske sinteze provode u posebnim mikrovalnim reaktorima.

Glavne prednosti mikrovalnog zagrijavanja su kraće vrijeme kemijske reakcije (nekoliko sati klasičnog zagrijavanja je usporedivo s nekoliko minuta mikrovalnog zagrijavanja), manja količina sporednih reakcija i nusprodukata, veće iskorištenje reakcije, poboljšana reproducibilnost te mogućnost provođenja nekih reakcija koje se ne odvijaju klasičnim putem.

2.4.1. Teorija mikrovalova

Mikrovalovi su elektromagnetski valovi koji u elektromagnetskom spektru zauzimaju područje između radiovalova i infracrvenog zračenja s frekvencijama od 0,3 GHz do 300 GHz i valnih duljina od 1 mm do 1 m (slika 6). Energija fotona mikrovalnog zračenja u ovom području frekvencija (0,0016 eV) nije dovoljna za prekidanje kemijskih veza, a također je niža i od energije Brownovog gibanja iz čega je vidljivo da mikrovalovi ne mogu izazvati kemijsku reakciju. Karakteristike mikrovalova su da se odbijaju od metala, prolaze kroz papir, staklo i plastiku te u hrani zagrijevaju vodu.¹⁹



Slika 6. Elektromagnetski spektar

Sinteza potpomognuta mikrovalnim zračenjem temelji se na svojstvu materije (tekućine ili krutine) da apsorbira mikrovalnu energiju i pretvara je u toplinu. Električna komponenta elektromagnetskog polja uzrokuje zagrijavanje dvama glavnim mehanizmima: dipolarnom polarizacijom i ionskom kondukcijom. Zračenje mikrovalnim frekvencijama rezultira usklađenim dipolima i ionima u primijenjenom električnom polju. Osciliranjem primijenjenog polja dipoli i ioni se pokušavaju reorijentirati, a u tom se procesu kroz trenje molekula i u dielektriku energija gubi u obliku topline. Količina topline oslobođena ovim procesom izravno je povezana sa sposobnosti matrice za usklađivanjem s frekvencijom primijenjenog polja. Ako dipol nema dovoljno vremena za prestrojavanje ili se prebrzo

preorijentira, ne dolazi do zagrijavanja. Frekvencija od 2,5 GHz koja se koristi u svim mikrovalnim reaktorima leži između dviju krajnosti i daje molekularnom dipolu dovoljno vremena za orijentiranje u polju, ali ne za precizno slijeđenje izmjeničnog polja.²⁰

Pri odabiru otapala za mikrovalnu sintezu odlučujući čimbenik nisu vrelišta, već sposobnost otapala da elektromagnetsku energiju pretvori u toplinu određene frekvencije i temperature što ovisi o dielektričnim svojstvima. Neka uobičajena otapala poput ugljikovog tetraklorida, benzena i dioksana ne posjeduju stalni dipolni moment pa propuštaju mikrovalove dok su metanol, etanol, dimetil-sulfoksid pogodna otapala za sintezu potpomognutu mikrovalnim zračenjem.

Pri klasičnom zagrijavanju toplina prelazi kondukcijom s tijela više temperature na tijelo niže temperature u neposrednom dodiru što je spor i nedjelotvoran proces. Temperatura na vanjskim površinama je viša u odnosu na temperaturu reakcijske smjese. Za razliku od klasičnog zagrijavanja, mikrovalnim zagrijavanjem molekule se direktno aktiviraju, reaktanti i otapalo apsorbiraju mikrovalnu energiju, a stijenke reakcijske posude su transparentne za mikrovalno zračenje.²¹

3. EKSPERIMENTALNI DIO

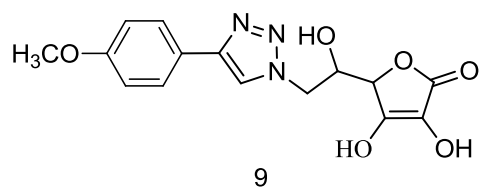
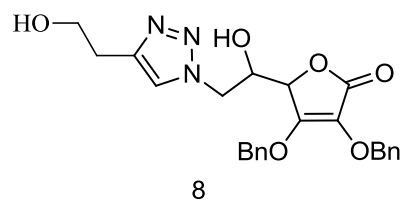
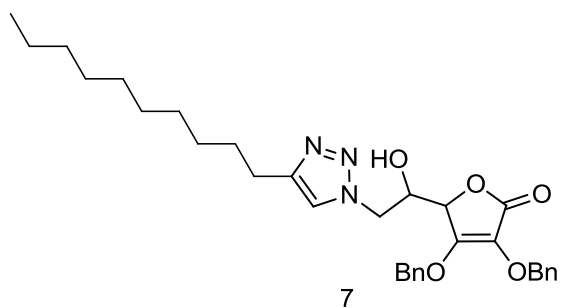
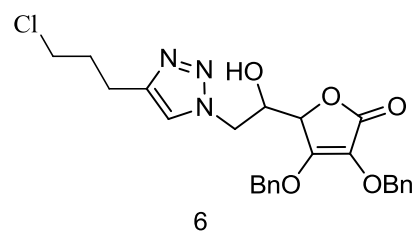
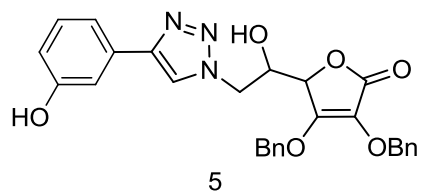
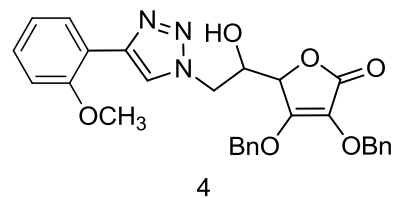
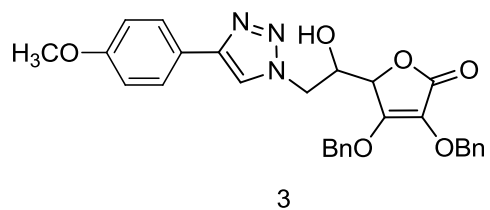
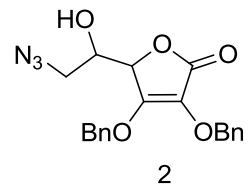
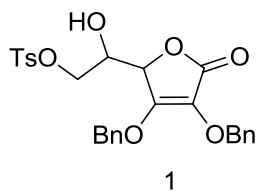
3.1. Opće napomene

Sva korištena otapala sušena su i pročišćavana prema preporučenom postupku sušenja agensima i/ili destiliranjem preko molekulskih sita veličine 3Å. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom (TLC) koja je provedena na pločama 60F-254 presvučenim slojem silikagela Merck u odgovarajućem sustavu otapala. Za detekciju izoliranih komponenata korištena je UV svjetlost valne duljine 254 nm.

Kromatografija na koloni provedena je na silikagelu (*Fluka*, 0,063 – 0,2 mm), staklene kolone punjene su pod utjecajem gravitacije, a kao eluens korištena je odgovarajuća smjesa diklormetana i metanola (CH_2Cl_2 : CH_3OH).

Spektri ^1H i ^{13}C NMR snimljeni su na spektrometru Bruker 300 i 600 MHz. Svi uzorci su otopljeni u $\text{DMSO}-d_6$ i mjereni pri 298 K. Kemijski pomaci (δ) u ^1H i ^{13}C NMR spektrima izraženi su u ppm u odnosu prema signalu DMSO na $\delta 2.50$ ppm za ^1H i $\delta 39.50$ ppm za ^{13}C . Pojedine rezonancije su pridružene na temelju kemijskih pomaka, intenziteta signala, multipliciteta signala i H-H konstante sprege.

3.2. Pregled sintetiziranih spojeva



Slika 7. Pregled sintetiziranih spojeva

3.3. Postupci za pripravu spojeva 1 – 9

6-*O*-tosil-2,3-*O*,*O*-dibenzil-L-askorbinska kiselina (1)

2,3-*O*,*O*-dibenzil-L-askorbinska kiselina (8,3 g; 9,597 mmol) se otopi u suhom diklormetanu (41 mL) i suhom piridinu (14 mL). Reakcijska smjesa se miješa na 0°C. U suhom diklormetanu (28 mL) otopi se *p*-toluensulfonil-klorid (2,9 g; 15,201 mmol) te se tijekom 2 h dokapava u reakcijsku smjesu. Reakcijska smjesa se miješa preko noći na sobnoj temperaturi. Otapalo se upari pod sniženim tlakom, a ostatak nakon uparavanja se ekstrahira (diklormetan : voda). Organski sloj se suši iznad magnezijevog sulfata (MgSO₄). MgSO₄ se zatim odfiltrira, a filtrat upari i pročisti kolonskom kromatografijom na silikagelu (diklormetan : metanol = 200 : 1). Spoj **1** je bijeli prah (7,8 g; 66 %).

C-6-azido-2,3-*O*,*O*-dibenzil-L-askorbinska kiselina (2)

Spoj **1** (2,0 g; 3,917 mmol) otopi se u DMF-u (27 mL). Otopini se doda natrijev azid (NaN₃; 0,5 g; 7,691 mmol) otopljen u vodi (3 mL). Reakcijska se smjesa preko noći miješa na 80°C nakon čega se otapalo upari, a ostatak nakon uparavanja se ekstrahira smjesom diklormetana i vode. Organski sloj se suši iznad magnezijevog sulfata (MgSO₄) koji se zatim odfiltrira. Filtrat se upari i produkt izolira kolonskom kromatografijom na silikagelu (diklormetan : metanol = 200 : 1). Spoj **2** je ulje (865,6 mg; 58 %).

¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 7,50 – 7,26 (m, 10H, OCH₂Ph), 5,71 (d, *J* = 6,6 Hz, 1H, OH), 5,24 (dd, *J* = 29,7, 11,7 Hz, 2H, OCH₂Ph), 4,98 (q, *J* = 11,2 Hz, 2H, OCH₂Ph), 4,87 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H, H-4), 3,97 – 3,79 (m, 1H, H-5), 3,39 (ddd, *J* = 12,6; 10,4; 6,3 Hz, 2H, H-6).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ 169,00 (C-1), 157,37 (C-3), 136,15 (Ph-q), 135,63 (Ph-q), 128,44 – 127,73 (Ph), 120,92 (C-2), 75,73 (C-4), 73,61 (OCH₂Ph), 72,75 (OCH₂Ph), 67,66 (C-5), 52,72 (C-6).

Opći postupak za pripravu spojeva 3 – 8 metodom A

Otopini spoja **2** (250,0 mg; 0,656 mmol) u DMF-u (3 mL) doda se *tert*-butanol (3 mL) i voda (3 mL), alkin (1,2 eq), a zatim bakrena žica (0,4 eq) i 1 M otopina bakrovog sulfata

pentahidrata ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$; 0,3 eq) . Reakcijska smjesa se zagrijava 1 h u mikrovalnom reaktoru (300 W) pri temperaturi 80°C . Otapalo se upari, a ostatak nakon uparavanja se pročisti kolonskom kromatografijom na silikagelu (diklormetan : metanol = 100 : 1). Spojevi **3 – 8** izolirani su kao bijeli prah.

Opći postupak za pripravu spojeva **3 i 5** metodom **B**

Spoj **1** otopi se u DMF-u (7 mL). Natrijev azid (NaN_3) se otopi u vodi (3 mL) i dokapa u reakcijsku smjesu. Smjesi se doda alkin (1,2 eq), bakrena žica (Cu; 0,4 eq) i 1 M otopina bakrovog sulfata pentahidrata ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$; 0,3 eq; 0,15 mL).). Reakcijska smjesa se zagrijava i miješa u mikrovalnom reaktoru 1 h na temperaturi 80°C i 300 W. Otapalo se upari, a produkt se izolira kolonskom kromatografijom na silikagelu (diklormetan : metanol = 100 : 1).

6-[4-(4-metoksifenil)-1,2,3-triazol-1-il]-2,3-*O,O*-dibenzil-L-askorbinska kiselina (**3**)

Metoda A: **2** (250,0 mg; 0,656 mmol); 1 M $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (0,2 mL); Cu (34,0 mg; 0,535 mmol); 4-metoksifenilaceten (0,1 mL; 0,787 mmol), *tert*-butanol (3 mL); DMF (3 mL); H_2O (3 mL); **3** (222,2 mg; 66 %).

Metoda B: **1** (250,0 mg; 0,490 mmol); NaN_3 (79,7 mg; 1,226 mmol); 1 M $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (0,15 mL); Cu (25,5 mg; 0,401 mmol); 4-metoksifenilaceten (0,08 mL; 0,588 mmol); DMF (7 mL), H_2O (3 mL), **3** (125,2 mg; 50 %).

^1H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8,54 (s, 1H, H-7), 7,82 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, Ph-2', Ph-6'), 7,52 – 7,33 (m, 10H, OCH_2Ph), 7,07 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, Ph-3', Ph-5'), 5,81 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H, OH), 5,28 (dd, $J = 43,8, 11,6$ Hz, 2H, OCH_2Ph), 5,11 – 4,96 (m, 3H, H-4, OCH_2Ph), 4,75 (dd, $J = 13,8, 3,7$ Hz, 1H, H-6), 4,48 (dd, $J = 13,8, 9,6$ Hz, 1H, H-6), 4,31 – 4,23 (m, 1H, H-5), 3,85 (s, 3H, OCH_3).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) δ 169,01 (C-1), 158,92 (Ph-q'), 157,23 (C-8), 146,01 (C-3), 136,11 (Ph-q), 135,57 (Ph-q), 128,70 – 126,42 (Ph), 123,39 (Ph-q'), 121,51 (C-7), 120,97 (C-2), 114,28 (Ph'), 75,58 (C-4), 73,65 (OCH_2Ph), 72,81 (OCH_2Ph), 67,28 (C-5), 55,11 (OCH_3), 52,40 (C-6).

6-[4-(2-metoksifenil)-1,2,3-triazol-1-il]-2,3-*O,O*-dibenzil-L-askorbinska kiselina (4)

Metoda A: **2** (250,0 mg; 0,656 mmol); 1 M CuSO₄ x 5H₂O (0,2 mL); Cu (34,0 mg; 0,535 mmol); 2-metoksifenilacetilen (0,1 mL; 0,787 mmol), *tert*-butanol (3 mL); DMF (3 mL); H₂O (3 mL); **4** (201,0 mg; 60 %).

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8,44 (s, 1H, H-7), 8,15 (dd, *J* = 7,7, 1,6 Hz, 1H, Ph-2'), 7,65 – 7,25 (m, 11H, Ph, Ph-4'), 7,13 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,05 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H, Ph-3'), 5,71 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H, OH), 5,23 (dd, *J* = 23,9, 11,6 Hz, 2H, OCH₂Ph), 5,01 (dd, *J* = 10,8, 1,2 Hz, 3H, H-4, OCH₂Ph), 4,72 (dd, *J* = 13,7, 3,4 Hz, 1H, H-6), 4,47 (dd, *J* = 13,7, 9,7 Hz, 1H, H-6), 4,28 – 4,15 (m, 1H, H-5), 3,91 (s, 3H, OCH₃).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ 169,01 (C-1), 157,24 (Ph-q'), 155,26 (C-8), 141,48 (C-3), 136,11 (Ph-q), 135,57 (Ph-q), 128,76 – 124,99 (Ph), 120,98 (Ph-q'), 120,58 (C-7), 119,15 (C-2), 111,49 (Ph'), 75,64 (C-4), 73,64 (OCH₂Ph), 72,78 (OCH₂Ph), 67,42 (C-5), 55,39 (OCH₃), 52,25 (C-6).

6-[4-(3-hidroksifenil)-1,2,3-triazol-1-il]-2,3-*O,O*-dibenzil-L-askorbinska kiselina (5)

Metoda A: **2** (250,0 mg; 0,656 mmol); 1 M CuSO₄ x 5H₂O (0,2 mL); Cu (34,0 mg; 0,535 mmol); 3-hidroksifenilacetilen (0,1 mL; 0,787 mmol), *tert*-butanol (3 mL); DMF (3 mL); H₂O (3 mL); **5** (209,1 mg; 64 %).

Metoda B: **1** (250,0 mg; 0,490 mmol); NaN₃ (79,7 mg; 1,226 mmol); 1 M CuSO₄ x 5H₂O (0,15 mL); Cu (25,5 mg; 0,401 mmol); 3-hidroksifenilacetilen (0,08 mL; 0,588 mmol); DMF (7 mL), H₂O (3 mL), **5** (126,4 mg; 52 %).

¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 9,51 (s, 1H, OH), 8,51 (s, 1H, H-7), 7,49 – 7,19 (m, 13H, Ph, Ph'), 6,72 (dt, *J* = 6,4, 2,5 Hz, 1H, Ph-4'), 5,73 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H, OH), 5,22 (dd, *J* = 43,7, 11,7 Hz, 2H, OCH₂Ph), 5,08 – 4,89 (m, 3H, H-4, OCH₂Ph), 4,69 (dd, *J* = 13,8, 3,6 Hz, 1H, H-6), 4,43 (dd, *J* = 13,8, 9,6 Hz, 1H, H-6), 4,25 – 4,18 (m, 1H, H-5).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 169,03 (C-1), 157,71 (Ph-q'), 157,25 (C-8), 146,14 (C-3), 136,11 (Ph-q), 135,57 (Ph-q), 131,98 (Ph-q'), 129,90 – 127,82 (Ph), 122,41 (C-7), 120,95 (C-2), 115,97 (Ph'), 114,80 (Ph-q'), 111,79 (Ph-q'), 75,58 (C-4), 73,66 (OCH₂Ph), 72,81 (OCH₂Ph), 67,25 (C-5), 52,44 (C-6).

6-[4-(3-klorpropil)-1,2,3-triazol-1-il]-2,3-*O,O*-dibenzil-L-askorbinska kiselina (6)

Metoda A: **2** (250,0 mg; 0,656 mmol); 1 M CuSO₄ x 5H₂O (0,2 mL); Cu (34,0 mg; 0,535 mmol); 5-klor-1-pentin (0,1 mL; 0,787 mmol), *tert*-butanol (3 mL); DMF (3 mL); H₂O (3 mL); **6** (184,9 mg; 58 %).

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7,91 (s, 1H, H-7), 7,53 – 6,95 (m, 10H, OCH₂Ph), 5,65 (d, *J* = 6,9 Hz, 1H, OH), 5,22 (q, *J* = 11,7 Hz, 2H, OCH₂Ph), 4,98 (d, *J* = 1,9 Hz, 2H, OCH₂Ph), 4,94 (d, *J* = 1,3 Hz, 1H, H-4), 4,60 (dd, *J* = 13,7, 3,8 Hz, 1H, H-6), 4,35 (dd, *J* = 13,7, 9,3 Hz, 1H, H-6), 4,22 – 4,02 (m, 1H, H-5), 3,68 (t, *J* = 6,5 Hz, 1H, H-3'), 2,75 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H, H-1'), 2,12 – 1,92 (m, 2H, H-2').

¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ 169,28 (C-1), 157,48 (C-3), 145,42 (C-8), 136,23 (Ph-q), 135,69 (Ph-q), 128,90 – 127,98 (Ph), 123,39 (C-7), 121,06 (C-2), 75,75 (C-4), 73,84 (OCH₂Ph), 72,97 (OCH₂Ph), 67,46 (C-5), 52,33 (C-6), 44,85 (C-3'), 31,88 (C-1'), 22,37 (C-2').

6-[4-decil-1,2,3-triazol-1-il]-2,3-*O,O*-dibenzil-L-askorbinska kiselina (7)

Metoda A: **2** (210,0 mg; 0,551 mmol); 1 M CuSO₄ x 5H₂O (0,2 mL); Cu (29,1 mg; 0,458 mmol); dodecin (0,14 mL; 0,661 mmol), *tert*-butanol (3 mL); DMF (3 mL); H₂O (3 mL); **7** (184,0 mg; 61 %).

¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 7,84 (s, 1H, H-7), 7,43-7,29 (m, 10H, OCH₂Ph), 5,62 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H, OH), 5,22 (dd, *J* = 42,3, 11,7 Hz, 2H, OCH₂Ph), 4,98 (q, *J* = 11,2 Hz, 2H, OCH₂Ph), 4,91 (d, *J* = 1,2 Hz, 1H, H-4), 4,58 (dd, *J* = 13,8, 3,9 Hz, 1H, H-6), 4,34 (dd, *J* = 13,8, 9,3 Hz, 1H, H-6), 4,18 – 4,07 (m, 1H, H-5), 2,59 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H, H-1'), 1,68 – 1,49 (m, 2H, H-2'), 1,34 – 1,22 (m, 14H, CH₂' x 7), 0,85 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ 169,02 (C-1), 157,23 (C-3), 146,56 (C-8), 136,12 (Ph-q), 135,58 (Ph-q), 128,69 – 127,78 (Ph), 122,82 (C-7), 120,98 (C-2), 75,58 (C-4), 73,66 (OCH₂Ph), 72,79 (OCH₂Ph), 67,37 (C-5), 52,06 (C-6), 31,25 (C-1'), 28,96 (CH₂'), 28,95 (CH₂'), 28,93 (CH₂'), 28,76 (CH₂'), 28,66 (CH₂'), 28,58 (CH₂'), 24,96 (CH₂'), 22,06 (CH₂'), 13,92 (CH₃).

6-[4-(2-hidroksietil)-1,2,3-triazol-1-il]-2,3-*O,O*-dibenzil-L-askorbinska kiselina (8)

Metoda A: **2** (250,0 mg; 0,656 mmol); 1 M CuSO₄ x 5H₂O (0,2 mL); Cu (34,0 mg; 0,535 mmol); 3-butin-1-ol (0,06 mL; 0,787 mmol), *tert*-butanol (3 mL); DMF (3 mL); H₂O (3 mL); **8** (155,3 mg; 53 %).

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7,87 (s, 1H, H-7), 7,56 – 7,19 (m, 10H, OCH₂Ph), 5,64 (d, *J* = 6,9 Hz, 1H, OH), 5,22 (dd, *J* = 23,3, 11,7 Hz, 2H, OCH₂Ph), 5,04 – 4,96 (m, 2H, OCH₂Ph), 4,93 (d, *J* = 1,3 Hz, 1H, H-4), 4,63 (t, *J* = 5,3 Hz, 1H, OH), 4,61 – 4,55 (m, 1H, H-6), 4,35 (dd, *J* = 13,7, 9,3 Hz, 1H, H-6), 4,19 – 4,08 (m, 1H, H-5), 3,62 (dd, *J* = 12,3, 6,9 Hz, 2H, H-2'), 2,76 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H, H-1').

¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ 169,01 (C-1), 157,22 (C-3), 144,00 (C-8), 136,10 (Ph-q), 135,56 (Ph-q), 128,67 – 127,77 (Ph), 123,42 (C-7), 120,96 (C-2), 75,57 (C-4), 73,64 (OCH₂Ph), 72,78 (OCH₂Ph), 67,36 (C-5), 60,35 (C-2'), 52,06 (C-6), 29,11 (C-1').

6-[4-(4-metoksifenil)-1,2,3-triazol-1-il]-L-askorbinska kiselina (9)

Spoj **3** (234,0 mg; 0,456 mmol) se otopi u suhom diklormetanu (25 mL). U atmosferi argona pri temperaturi -65°C dokapa se boron-triklorid (BCl₃; 2,8 mL). Reakcijska smjesa se miješa na temperaturi -65°C 2 h, a zatim se preko noći ostavi u zamrzivaču. U reakcijsku smjesu se potom doda smjesa otapala diklormetana i metanola (diklormetan : metanol = 1: 1; 10 ml) i ostavi miješati 30 min. Otapalo se upari, a ostatak nakon uparavanja se otopi u metanolu i otopini se doda Amberlit IRA-743. Amberlit se odfiltrira, otapalo upari, a produkt se izolira kolonskom kromatografijom na silikagelu (diklormetan : metanol = 10 : 1). Spoj **9** je bijeli prah (81,8 mg, 54 %).

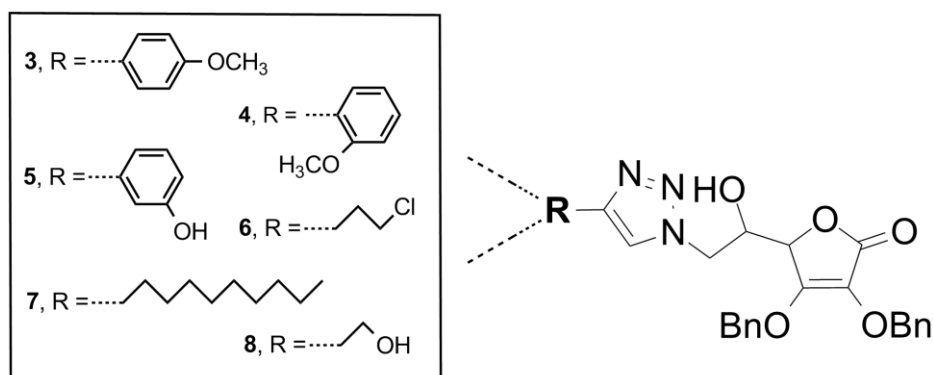
¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11,18 (s, 1H, OH), 8,45 (s, 2H, H-7. OH), 7,77 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, Ph-2', Ph-6'), 7,01 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, Ph-3', Ph-5'), 5,53 (s, 1H, OH), 4,76 (d, *J* = 1,5 Hz, 1H, H-4), 4,66 (dd, *J* = 13,7, 3,9 Hz, 1H, H-6), 4,40 (dd, *J* = 13,7, 9,3 Hz, 1H, H-6), 4,28 – 4,19 (m, 1H, H-5), 3,79 (s, 1H, OCH₃).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 170,29 (C-1), 158,91 (Ph-q'), 152,04 (C-3), 145,94 (C-8), 126,42 (Ph'), 123,42 (Ph-q'), 121,53 (C-7), 118,28 (C-2), 114,29 (Ph'), 75,54 (C-4), 67,12 (C-5), 55,12 (OCH₃), 52,74 (C-6).

4. REZULTATI I RASPRAVA

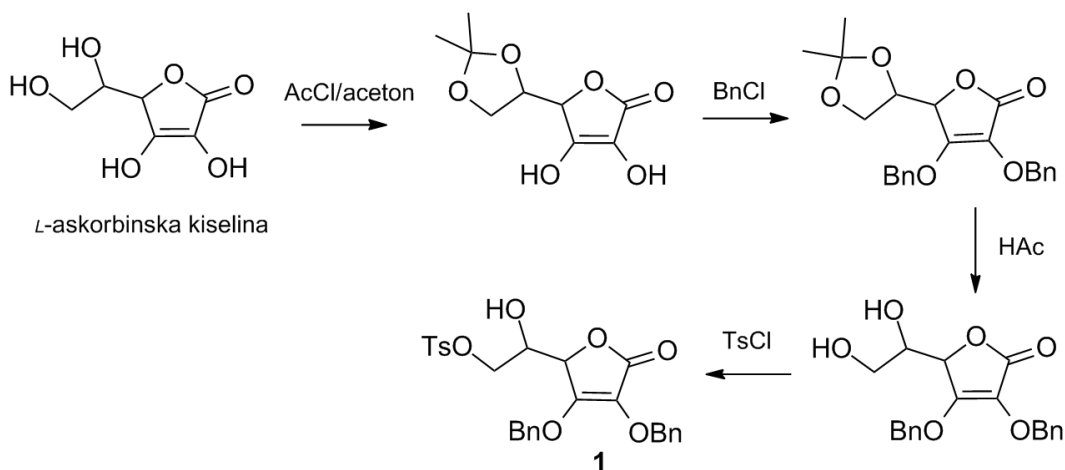
4.1. Sinteze spojeva

Cilj ovog rada bila je sinteza potencijalno biološki aktivnih 1,2,3-triazolnih derivata L-askorbinske kiseline regioselektivnom reakcijom 1,3-dipolarne cikloadicije uz Cu(I) kao katalizator. Sintetizirani su 1,2,3-triazolni derivati L-askorbinske kiseline (**3** – **8**) s različitim supstituentima u položaju C-4 triazolnog prstena (slika 8).



Slika 8. 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazolni derivati L-askorbinske kiseline

Sinteza je provedena uz tosilatni derivat L-askorbinske kiseline (**1**) kao početni spoj koji je prethodno sintetiziran iz L-askorbinske kiseline u četiri stupnja (shema 4).



Shema 4. Prikaz sinteze tosilatnog derivata L-askorbinske kiseline (**1**)

Prvi korak je reakcija L-askorbinske kiseline s acetil-kloridom i acetonom pri čemu nastaje 5,6-O,O-izopropiliden-L-askorbinska kiselina. U drugom koraku nastali produkt reagira s benzil-kloridom i kalijevim karbonatom u DMF-u pri čemu nastaje 2,3-O,O-

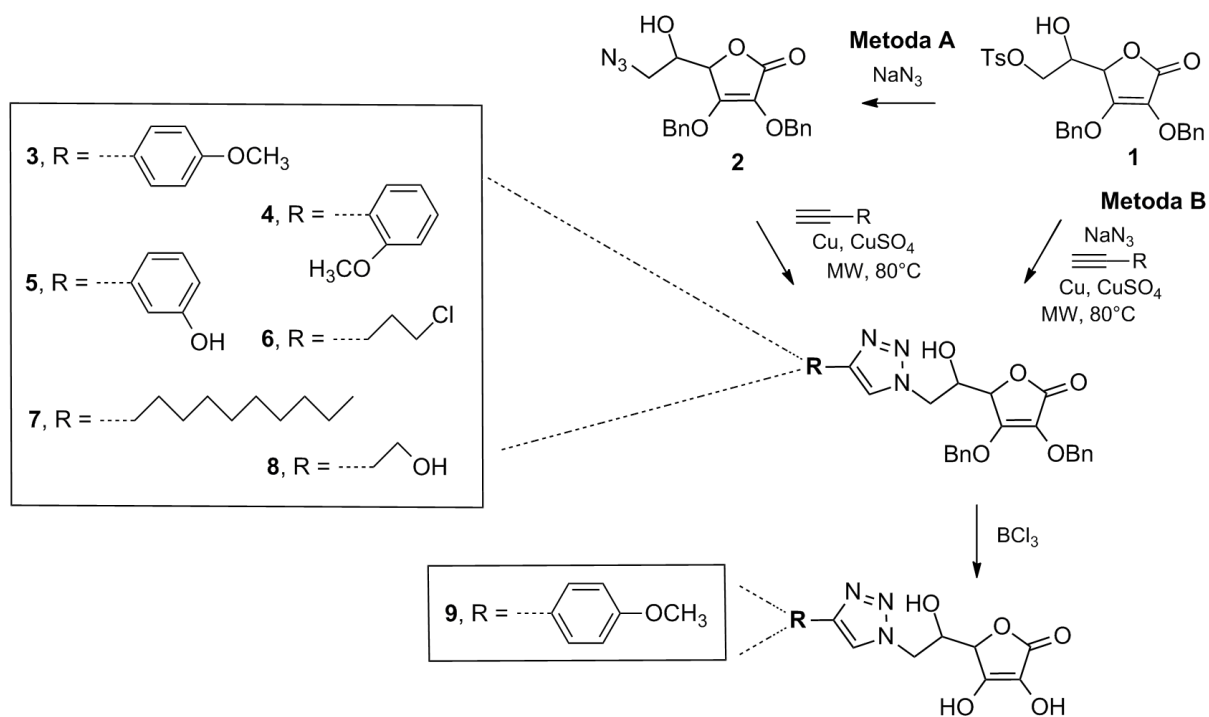
dibenzil-5,6-*O,O*-izopropiliden-L-askorbinska kiselina. Reakcijom s octenom kiselinom i metanolom uklonjena je izopropilidenska zaštita pri čemu je izolirana 2,3-*O,O*-dibenzil-L-askorbinska kiselina. Tosilatni derivat (**1**) dobiven je reakcijom 2,3-*O,O*-dibenzil-L-askorbinske kiseline s *p*-toluensulfonil-kloridom i pirimidinom u iskorištenju od 66%.

1,4-disupstituirani 1,2,3-triazolni derivati L-askorbinske kiseline dobiveni su na dva načina, metodom A i metodom B (shema 5).

Metoda A sastoji se od 2 koraka i uključuje izolaciju azidnog derivata L-askorbinske kiseline (**2**). Tosilatni derivat (**1**) se reakcijom s natrijevim azidom prevodi u azidni derivat (**2**) koji se izolira, a zatim reakcijom 1,3-dipolarne cikloadicije azidnog derivata i odgovarajućih alkena nastaju 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazolni derivati L-askorbinske kiseline. Reakcijski uvjeti zahtijevaju prisutnost bakrene žice, bakrovog sulfata pentahidrata, a reakcija se odvija u mikrovalnom reaktoru pri 80°C. Spojevi **3** – **8** sintetizirani su metodom A, a iskorištenja iznose: 66% (**3**), 60% (**4**), 64% (**5**), 58% (**6**), 61% (**7**) i 63% (**8**).

Metoda B uključuje tandemsku sintezu pri čemu se azidni derivat (**2**) koji nastaje *in situ* iz tosilatnog derivata L-askorbinske kiseline (**1**) ne izolira iz reakcijske smjese, već reakcijom s odgovarajućim alkinom odmah prelazi u 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazolni derivat L-askorbinske kiseline. Spojevi **3** i **5** pripremljeni su metodom B, a iskorištenja iznose 50% (**3**) i 52% (**5**).

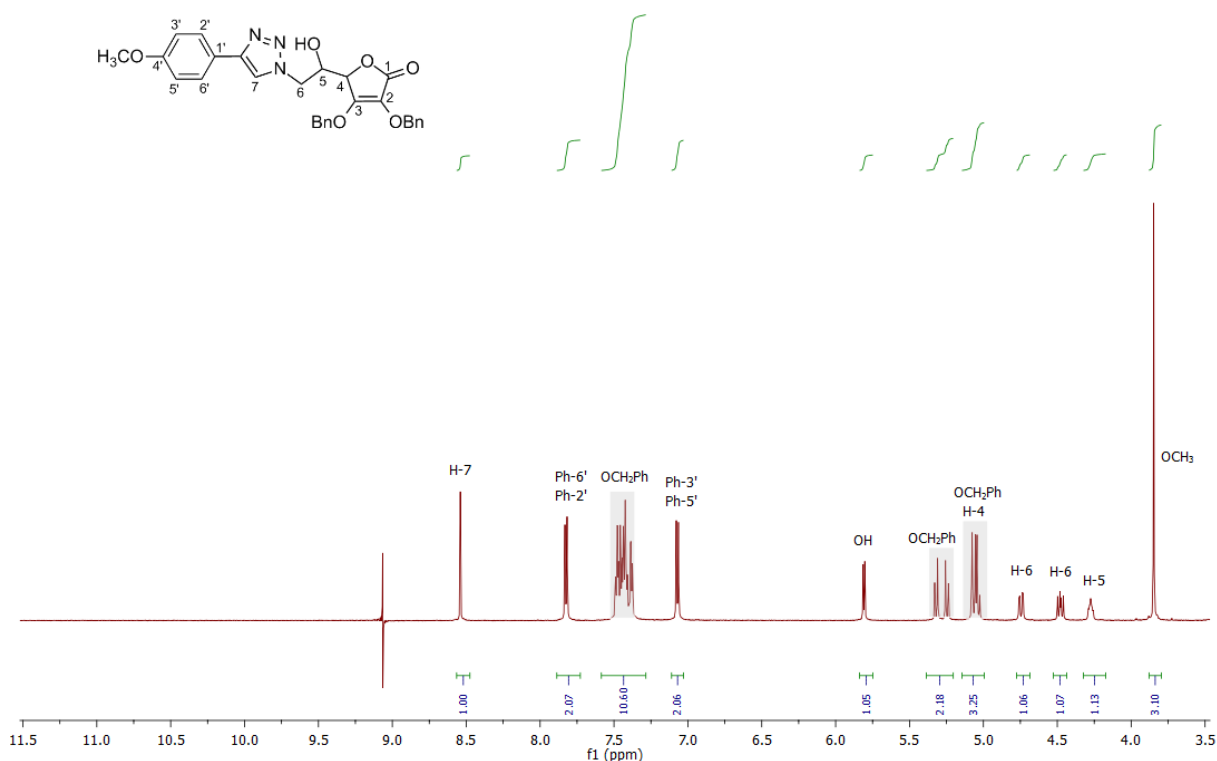
Kako bi se sintetizirao derivat sa slobodnim hidroksilnim skupinama, spoju **3** su reakcijom s boron-trikloridom uklonjene benzilne zaštitne skupine te je izoliran spoj **9**. Iskorištenje ove reakcije iznosi 54%.



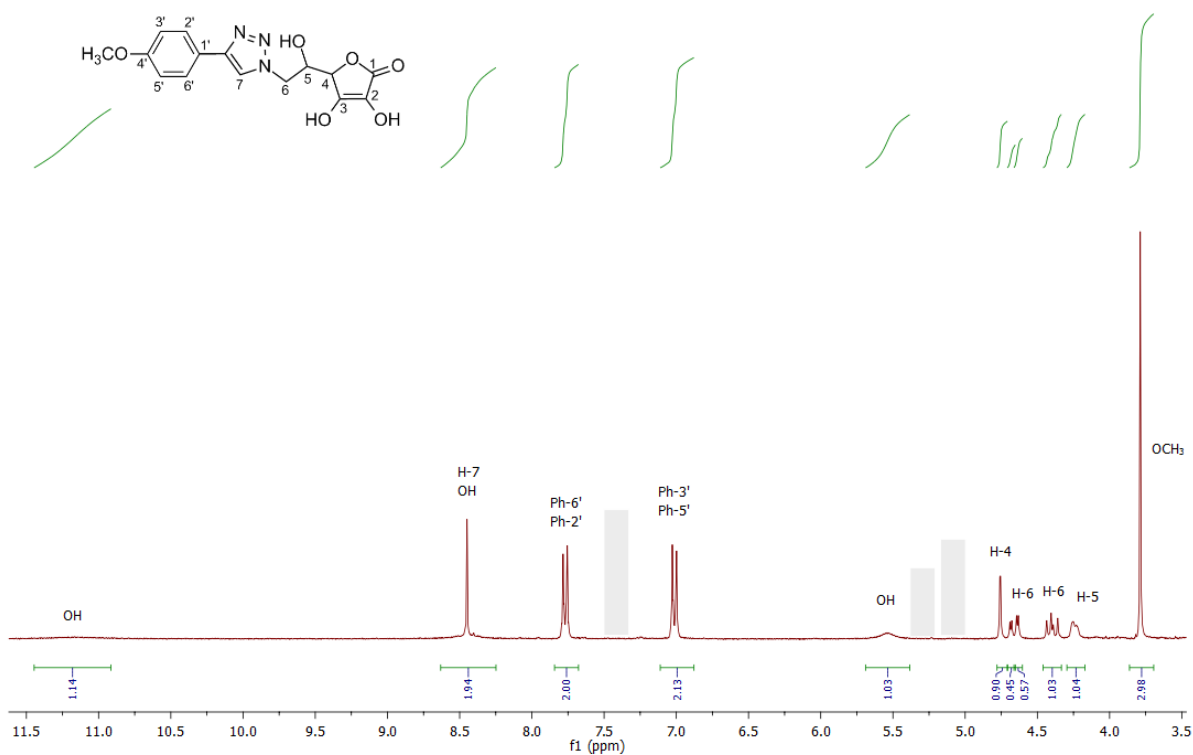
Shema 5. Prikaz sinteze 1,4-disupstituiranih 1,2,3-triazolnih derivata L-askorbinske kiseline

4.2. Analiza spektara ^1H NMR

Analizom spektara ^1H i ^{13}C NMR spojeva **1** - **9** na temelju karakterističnih signala određenih skupina potvrđene su strukture spojeva.

Slika 9. Spektar ^1H NMR spoja **3**

U spektru ^1H NMR spoja **3** prisutni su signali metilenskih protona benzilne zaštitne skupine (5,28 i 5,11 – 4,96 ppm) te signali fenilnih protona benzilne zaštite (7,52 – 7,33 ppm). Vidljiv je signal koji pripada protonu laktonskog prstena L-askorbinske kiseline H-4 (5,11 – 4,96) te signali koji odgovaraju protonima H-5 i H-6 (4,75 – 4,23 ppm). Nadalje, u spektru je prisutan signal protona hidroksilne skupine (5,81 ppm). Nastanak triazolnog prstena potvrđen je karakterističnim signalom protona H-7 u aromatskom području spektra (8,54 ppm). Vidljivi su i signali protona 4-metoksifenilnog supstituenta (Ph-2', Ph-3', Ph-5', Ph-6', 7,82 – 7,07 ppm; OCH_3 , 3,85 ppm).

Slika 10. ^1H NMR spektar spoja **9**

Spoj **9** dobiven je uklanjanjem benzilnih zaštitnih skupina sa spoja **3**. U odnosu na spektar ^1H NMR spoja **3**, u spektru spoja **9** nisu prisutni signali metilenskih i fenilnih protona benzilne skupine (zasjenčano), a pojavljuju se dva nova signala koja odgovaraju hidroksilnim skupinama (11,18 i 8,45 ppm).

5. ZAKLJUČCI

Višestupnjevitom sintezom sintetiziran je tosilatni derivat L-askorbinske kiseline (**1**) kao prekursor za sintezu azida L-askorbinske kiseline (**2**).

Regioselektivnom 1,3-dipolarnom cikloadicijom azidnog derivata L-askorbinske kiseline (**2**) i odgovarajućih alkina s Cu(I) kao katalizatorom, prema konceptu "klik" kemije, uspješno su sintetizirani 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazolni derivati L-askorbinske kiseline (**3 – 8**) s različitim supstytutentima u položaju C-4 triazolnog prstena (metoda A).

Tandemskom reakcijom uz tosilatni derivat L-askorbinske kiseline (**1**) kao polazni spoj bez izolacije azidnog derivata (**2**) također su sintetizirani 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazolni derivati L-askorbinske kiseline (**3 i 5**) (metoda B).

Postepeni sintetski put (metoda A) u kojem je provedena izolacija azidnog derivata L-askorbinske kiseline (**2**) pri sintezi 1,2,3-triazolnih derivata L-askorbinske kiseline dao je bolje iskorištenje u odnosu na tandemsku reakciju (metoda B).

Uklanjanjem 2,3-*O,O*-dibenzilnih zaštitnih skupina u spoju **3** dobiven je spoj sa slobodnim hidroksilnim skupinama (**9**).

U tijeku su ispitivanja utjecaja supstytutenata u položaju C-4 triazolnog prstena novopripravljenih spojeva (**3 – 9**) na antiproliferativno djelovanje na zloćudne tumorske stanice porijeklom iz čovjeka kao i ispitivanje antioksidativnih svojstava spoja **9**.

6. LITERATURA

1. Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. (2013) Razvoj lijekova. U Bukan G., ur., Biokemija. Zagreb: Školska knjiga, 1002 – 1008.
2. Gazivoda T., Plevnik M., Plavec J., Kraljević S., Kralj M., Pavelić K., Balzarini J., De Clercq E., Mintas M., Raić-Malić S., The novel pyrimidine and purine derivatives of L-ascorbic acid: synthesis, one- and two-dimensional ^1H and ^{13}C NMR study, cytostatic and antiviral evaluation, *Bioorg. Med. Chem.*, 2005, **13**, 131 – 32.
3. Du J., Cullen J.J., Buettner G. R.: Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer, *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, **1826**, 443 – 57.
4. Barrita J.L.S, Sanchez M.S.S. (2013). Antioxidant Role of Ascorbic Acid and His Protective Effects on Chronic Diseases, Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases – A Role for Antioxidants, Morales-Gonzales J.A. (Ed.), in Tech, DOI: 10.5772/52181
5. Domitrović R., Vitamin C u prevenciji i liječenju bolesti, *Biochemia Medica*, 2006, **16**, 107 – 25.
6. Padayatty S.J., Katz A., Wang Y., Eck P., Kwon O., Lee J.H., Chen S., Corpe C., Dutta A., Dutta S.K., Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention, *Cancer Research*, 2015, **39**, 663 – 81.
7. Niki E., Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals, *Am. J. Clin. Nutr.* 1991, **54**, 19 – 24.
8. Gonzales M.J., Miranda-Massari J.R., New Insights on Vitamin C and Cancer, Springer Briefs in Cancer Research, 2014, 17 – 26
9. Mastrangelo D., Massai L., High Doses of Ascorbate (Vitamin C): A New Frontier in the Treatment of Intraocular Cancer, *Adv. Ophthalmol. Vis. Syst.* 2016, **4**, 00090.
10. Tripathi R.P., Singh B., Singh Bisht S., Pandey J., L-Ascorbic acid in Organic Synthesis, An Overview, *Curr. Org. Chem.*, 2009, **13**, 99 – 122.
11. Gazivoda T., Šokčević M., Kralj M., Šuman L., Pavelić K., Clercq E.D., Snoeck R., Balzarini J., Mintas M., Raić-Malić S., Synthesis and Antiviral and Cytostatic valuations of the New C-5 Substituted Pyrimidine and Furo[2, 3-*d*]pyrimidine 4', 5'-Didehydro-L-ascorbic Acid Derivatives, *J. Med. Chem.*, 2007, **50**, 4105 – 112.

12. Agalave G.S., Maujan R. S., Pore V.S., Click Chemistry: 1,2,3-Triazoles as Pharmacophores, *Chem. Asian J.*, 2011, **6**, 2696 – 718.
13. Raić-Malić S., Mešćić A., Recent Trends in 1,2,3-Triazolo-Nucleosides as Promising Anti-Infective and Anticancer Agents, *Curr. Med. Chem.*, 2015, **22**, 1462 – 99.
14. Saftić D., Krstulović L., Bajić M., Žinić B., 1,3-Dipolarna cikloadicija (I. Dio): Dobivanje triazolnih derivata, *Kem. Ind.*, 2015, **64**, 481 – 98.
15. Kamijo S., Jin T., Huo Z, Yamamoto Y., A one-pot procedure for the regiocontrolled synthesis of allyltriazaes via the Pd-Cu bimetallic catalyzed three-component coupling reaction of nonactivated terminal alkynes, allyl carbonate, and trimethylsilyl azide, *J. Org. Chem.*, 2004, **69**, 2386 – 2393.
16. Kolb H.C., Finn M.G., Sharpless K.B.: Click Chemistry, Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, **40**, 2004 – 21.
17. Hein C. D., Liu X.-M., Wang D., Click chemistry, a powerful tool for pharmaceutical sciences, *Pharm. Res.*, 2008, **25**, 2216 – 30.
18. Husigen R., Szeimies G., Mobius L., *Chem. Ber.*, 1967, **100**, 2494 – 2507.
19. Blekić M., Jambrak A. R., Chemat F., Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva, *Croat. J. Food Sci. Technol.*, 2011, **3**, 32 – 47.
20. Kappe C.O., Controlled Microwave Heating in Modern Organic Chemistry, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, **43**, 6250 – 53.
21. Zrinski I., Eckert-Maksić M., Primjena mikrovalnog zračenja u organskoj sintezi, *Kem. Ind.*, 2005, **43**, 469 – 71.

7. ŽIVOTOPIS

Zovem se Aleksandra Kavgić. Rođena sam 26. srpnja 1989. godine u Zagrebu gdje sam završila osnovnu školu. Nakon osnovnog obrazovanja upisala sam Prirodoslovnu školu Vladimira Preloga, smjer prirodoslovna gimnazija. Sudjelovala sam na brojnim natjecanjima od kojih se ističe Državno natjecanje u poznavanju hrvatskoga jezika 2006. godine i Državno natjecanje iz kemije 2007. godine. Maturirala sam 2008. godine te upisala Pravni fakultet u Zagrebu, a 2013. godine upisala sam i preddiplomski studij Primijenjena kemija na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. Kao student istraživač sudjelujem na znanstvenom projektu prof. dr. sc. Silvine Raić-Malić *Sinteza i citostatska ispitivanja biblioteke novih dušikovih heterocikla* (SCIENCENTRY).

Popis priopćenja:

- A. Kavgić, A. Mešćić, V. Stepanić, S. Raić-Malić, Sinteza i antioksidativna svojstva L-askorbinske kiseline i njezinih derivata // 25. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, Zagreb, 18. – 19.02.2016 (poster).